



HRM分析试剂盒 (EvaGreen) (FP210) 操作指南

天根生化科技（北京）有限公司

版本号：20170424

WWW.TIANGEN.COM

实验准备

1. DNA 样本
2. 移液器及配套枪头 (RNase-free)
3. 1.5 ml 离心管 (RNase-free) , 200 μ l PCR管 (RNase-free)
4. 涡旋振荡器, 台式离心机, 金属浴/ PCR仪



Step 1



融解 $2\times$ HRM Analysis PreMix, $50\times$ ROX Reference Dye, DNA模板, 引物和RNase-Free ddH₂O, 并将所有试剂在室温下平衡并彻底混匀, 之后置于冰上。

使用前将每种溶液涡旋振荡混匀, 简短离心以收集残留在管壁的液体。

Step 2

建议在冰上按下表进行Real Time PCR反应液的配制

组成成分	50 μ l 体系	25 μ l 体系	20 μ l 体系	终浓度
2 \times HRM Analysis PreMix	25 μ l	12.5 μ l	10 μ l	1 \times
正向引物(10 μ M)	1.5 μ l	0.75 μ l	0.6 μ l	0.3 μ M
反向引物(10 μ M)	1.5 μ l	0.75 μ l	0.6 μ l	0.3 μ M
DNA模板	—	—	—	—
50 \times ROX Reference Dye	—	—	—	—
RNase-free ddH ₂ O	至50 μ l	至25 μ l	至20 μ l	—



Tips

1. 配制定量混合液时，应首先确定所需的反应数量，然后在反应数量的基础上增加10%-20%，计算体系配制数量。例如，一共需要做5个定量反应时，则体系配制数量至少为6；一共需要做10个定量反应时，则体系配制数量至少为11；一共需要做20个定量反应时，体系配制数量至少为22。以此类推。
2. 按配制数量，先计算除DNA模板和水之外的组分所需的用量，在冰上将所有组分共同配制到同一管中制成混合物，彻底混匀，短暂离心。
3. 计算每个样本所需加入的DNA模板的体积和所需补充的ddH₂O的体积。如果每个样本所需的ddH₂O体积都相同，可计算总体所需的ddH₂O体积并加入到混合物中，彻底混匀。

试剂	1个50 μl体系 使用量	6个50 μl体系 使用量	11个50 μl体系 使用量	22个50 μl体系 使用量
2×HRM Analysis PreMix	25 μl	150 μl	275 μl	550 μl
正向引物(10 μM)	1.5 μl	9 μl	16.5 μl	33 μl
反向引物(10 μM)	1.5 μl	9 μl	16.5 μl	33 μl
50×ROX Reference Dye	根据实际情况计算加入			
RNase-free ddH ₂ O	根据实际情况计算加入			

4. 将混合物分装至每个检测管/孔中，按混合物—cDNA—ddH₂O（如果需要）的顺序加样，配制体系，彻底混匀。

Tips

使用预混Mix再分装的方法可以有效提高实验的重复性。配制和分装时请在冰上操作。配置PCR体系时避免强光照射。

20 μ l反应体系中，基因组DNA模板的使用量一般小于100 ng，并尽量保持不同反应之间有相同的模板量。模板纯度要求：OD260/280：1.6-2.0，OD260/230：1.5-2.0。

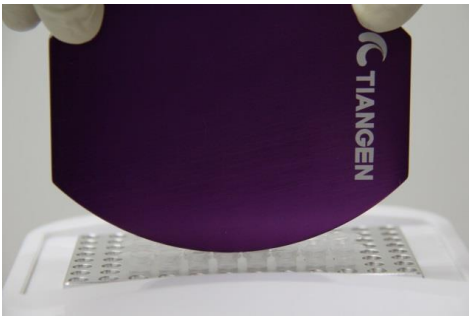
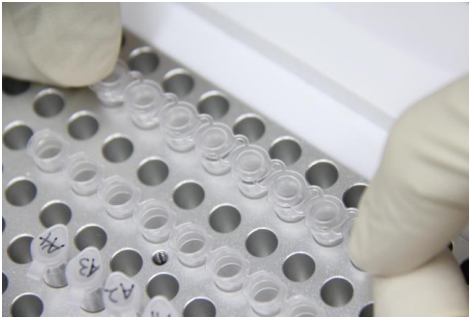
由于HRM具有很高的灵敏性，因此在条件允许的情况下推荐使用50 μ l反应体系，大的反应体系可以提高反应重复性，减少实验误差对溶解曲线的负面影响。

引物终浓度为0.3 μ M可以在大多数体系中获得良好的扩增结果。扩增效率不高时，可增加PCR反应体系中的引物浓度；发生非特异扩增时，可适当减少PCR反应体系中的引物浓度。需要进一步优化引物浓度的，可以在0.2-0.5 μ M范围内调整。

几种常见仪器的最适ROX Reference Dye浓度见下表：

仪器	终浓度
ABI 7900HT	5 \times （例如：5 μ l ROX/50 μ l体系）
ABI 7500Fast, Vii7等	1 \times （例如：1 μ l ROX/50 μ l体系）
Roche仪器，Bio-Rad仪器，Qiagen仪器等	无需添加

Step 3



使用八连排管时，体系配制分装完毕后，改好管盖，用压盖器压实。在管盖两端做好标记，不要标记在检测孔正上方的管盖上，以免影响荧光读数。

使用96孔板时，体系配制分装完毕后，使用封口膜封板，压实，在孔板四周或未加样的检测孔出标记。

Step 4



使用微孔板离心机短暂离心96孔板或八连排管。注意管底朝向外侧，注意配平。
离心八连排管时，将八连排管置于管架上，用固定片固定后进行离心。

Step 5



阶段	循环	温度	时间	内容	荧光信号采集
预变性	1×	95°C	2 min	预变性	否
PCR反应	40×	95°C	10 sec	变性	否
		60°C	30 sec	退火/延伸	是
熔解曲线分析(Melting/Dissociation Curve Stage)					

在开始反应前，向厂家确认所用qPCR仪是否适用于HRM实验。

将样本转移至荧光定量PCR仪，编好程序，开始qPCR反应。